

Rahnella aquatilis AY2000균주가 생산하는 항효모성 물질의 이화학적 특성

강민정 · 이복규¹ · 이은우 · 김광현*

동의대학교 자연과학대학 생명응용학과, ¹동의대학교 자연과학대학 분자생물학과

Physicochemical Properties of an Anti-Yeast Substance Produced by *Rahnella aquatilis* Strain AY2000.

Kang, Min-Jung, Bok-Kyu Lee¹, Eun-Woo Lee and Kwang-Hyeon Kim*. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Molecular Biology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – *Rahnella aquatilis* strain AY2000 produces an anti-yeast substance (AYS), however activity of the AYS has a declining tendency during storage. To investigate what has been decreased activity of the AYS, the AYS was treated with various physicochemical agents in this paper. The activity of AYS was decreased by heat treatment. Thiol reagent such as β -mercaptoethanol or dithiothreitol was also another factor decreasing the activity of AYS. However, pH, EDTA, and NaCl were not factors decreasing the activity of AYS. Use of methanol to precipitate the AYS was also decreased the activity of AYS. The activity of AYS was not lost after Sepharose S-400 gel filtration. However, the AYS activity was completely lost, when a polysaccharide and a unknown substance (230 nm absorption) among components of the AYS was separated by DEAE-cellulose chromatography. MIC of the AYS against *S. cerevisiae* was usually determined at 7.8-15.6 μ g/ml.

Key words: Anti-yeast substance, stability, *Rahnella aquatilis*, physicochemical properties

서 론

Rahnella aquatilis 속의 균주는 Enterobacteriaceae과에 속하는 그람음성 간균[1]으로 자연계에 널리 존재하고 있다[4, 8, 9, 18]. 이들 균주들은 일반적으로 물이나 토양에 주로 존재하지만 37°C 이상에서는 생육하지 못하는 특성이 있다[1]. 따라서 *R. aquatilis* 속 균주들의 인체감염성에 대한 연구[5] 보다 오히려 이들 균주들의 다양한 능력 즉, 질소 고정능력[2], 인산 용해능력[11], 균체 외로 분비하는 고분자 당류의 생성능력[14, 17, 19] 및 생물학적 방제능력[3, 7, 12] 등을 포함한 각 균주들의 특성에 대한 보고가 점차로 증가하고 있다. 본인 등은 전보[16]에서 기술한 바와 같이 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida albicans*에 대해 항효모성 물질(AYS)을 생성하는 독특한 *R. aquatilis* 속의 AY2000균주를 분리 동정하였다. 또한 정제된 AYS는 주로 이종의 당류들로 구성된 고분자 당과 230 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 미지의 물질(unknown substance)로 구성되어 있으며, 효모의 사멸 보다 생육억제능이 있는 새로운 항효모 작용을 가진 물질이라고 보고하였다[16]. 그러나 이 AYS도 저장 중에 효모에 대한 활성이 저하되는 경향이 있어 AYS에 대한 실험을 계속 진행하는데 어려움

이 많았다. 따라서 본 연구에서는 AYS의 활성저하의 원인을 알아보기 위하여 AYS에 여러 가지 이화학적 처리를 행하고 AYS의 활성저하에 영향을 주는 각종 요인들을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주, 배지 및 시약

본인 등이 분리한 *R. aquatilis* AY2000균주 [16]가 사용되었으며, AY2000균주에서 항효모성 물질(AYS)을 생산하는 배지는 MYCS 배지[malt extract; 3.0 g, yeast extract; 3.0 g, 100 μ M FeCl₃, distilled water; 1 L. pH 5.4]가 사용되었다 [10]. 또한 AYS의 활성측정은 *S. cerevisiae* ATCC2120로 행하였으며, 이때 효모는 YM배지 [16]에서 생육되었다.

균주 배양법 및 AYS의 조제

먼저 MYCS 액체배지(30 ml)가 함유된 100 mL용 삼각 flask에 AY2000균주를 접종하고, 25°C에서 하룻밤(15-17시간) 동안 전 배양하였다. 그 후 전 배양액은 다시 MYCS액체배지(100 mL)가 함유된 500 mL용 삼각 flask에 1% 농도로 접종하여 25°C에서 24시간 동안 진탕 배양하고, 배양액은 원심분리(12000 rpm, 10 min, 4°C)하여, 침전된 세포는 제거하고 AYS가 함유된 상층액을 모았다. 모든 상층액에 isopropanol을 상층액의 2배량으로 가하고 충분히 침전이 형성되도록 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 형성된 침전물

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-1533; Fax: 82-51-890-1532

E-mail: kimkh@deu.ac.kr

은 다시 냉각 원심분리(12000 rpm, 10 min, 4°C)를 행하고, 침전물은 미리 냉각된 증류수(4°C)에 적당히 녹인 후 혼합된 isopropanol을 제거하기 위해 투석(SPECTRA/POR; MW cutoff 6,000-8,000, 4°C)하였다. 투석된 용액은 다시 진공 동결 건조하여 -20°C에 보관하면서 시료(AYS)로 사용하였다.

AYS의 활성측정

AYS의 활성측정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards에서 기술한 Micro-dilution법[15]으로 행하였다. 즉, 미리 멸균된 MYCS배지에 tetracycline(Tc)를 5 µg/mL가 함유되도록 조제하였다. 그 후 Tc가 함유된 MYCS배지는 미리 96-well microplate의 각 well에 100 µL씩 넣고, AYS용액(10 mg/mL) 100 µL는 microplate의 lane의 첫 well에 주입하고 잘 혼합하여 연속적으로 AYS를 2배씩 희석하였다. 희석된 AYS가 함유된 각 well에는 다시 100 µL MYCS배지를 가하여 200 µL/well이 되도록 한 후 미리 하룻밤(28°C) 동안 배양된 효모(10 µL/well)를 접종하고 항온기(28°C)에서 24시간 배양시켰다. 효모가 배양된 microplate는 ELISA Reader로 탁도(OD₆₅₀)를 측정하였으며, 효모가 100% 생육이 억제된 최소한의 AYS 양으로 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)를 산출하였고, 대조구로는 amphotericin B가 사용되었다. 또한 MIC는 2회 반복실험을 통해 측정된 MIC의 평균값의 범위로 나타내었다.

당 및 단백질 정량

당 측정은 phenol-sulfuric acid법[6]으로 행하고, glucose를 기준으로 산출하였으며, 단백질은 Lowry 방법[13]으로 측정하고 BSA(Bovine Serum Albumin)를 기준으로 산출하였다.

열, pH 및 각종 화학물질들에 대한 안정성

AYS의 열에 대한 안정성은 미리 AYS(10 mg)을 1 mL 멸균수에 용해시킨 후 50°C에서 시간 별로 열처리를 행한 후 즉시 얼음에 넣어 반응을 정지시키고, 잔존하는 AYS의 활성을 Micro-dilution 법[15]으로 측정하였다. AYS의 pH에 대한 안정성은 미리 AYS(10 mg)를 1 mL 완충액[20 mM 초산완충액(pH 4.5 & pH 5.5)과 인산완충액(pH 6.5-8.5)]에 각각 용해시킨 후 50°C에서 2시간 동안 열처리하였다. 그 후 열처리된 AYS용액은 즉시 얼음에 넣어 반응을 정지시키고, 증류수로 투석한 후 잔존활성을 Micro-dilution법[15]으로 측정하였다. AYS의 각종 화학물질에 대한 안정성은 먼저 AYS를 10 mg씩 평량하여 각 화학물질(10 mM EDTA, 0.8 M NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol 및 10 mM dithioerythritol)이 함유된 멸균수(1 mL)에 용해시킨 후 28°C에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후 처리한 각 화학물질을 제거하기 위해 증류수로 하룻밤 동안 투석(4°C)하고, 잔존활성은 Micro-

dilution법[15]으로 측정하였다.

AYS의 chromatography에 의한 분리

AYS(10 mg)는 gel 여과를 행하기 위해 미리 1ml 증류수에 용해시킨 후 원심분리(12000 rpm, 30 min) 하여 침전물은 제거하고, 상층액은 다시 여과(0.45 µm)시킨 후 Sephacryl S-400 gel(Pharmacia Biotech-17-0609-10)이 함유된 column(1.3×85 cm)에서 증류수로 7.6 mL/hr 유속으로 gel여과를 행하였다. 분획은 5 mL/tube씩 행하였으며, 각 분획은 당(phenol sulfuric acid법), 단백질(280 nm) 및 미지의 물질(230 nm)을 측정하였다. 또한, 이온교환수지를 행하기 위해 AYS(50 mg)을 20mM 초산완충액(pH 5.0) 1 mL에 용해시킨 후 미리 팽윤된 DEAE-cellulose 이온교환수지(Sigma; D-3764)가 함유된 column(1.3×5.0 cm)에서 40 mL/hr 유속으로 통과시켜서 비흡착 물질은 모으고, 흡착물질은 다시 NaCl이 함유된 20 mM 초산완충액(pH 5.0)으로 단계별로 NaCl 농도(0.1 M-1.0 M NaCl)를 증가 시키면서 흡착된 물질을 용출시켰다. 특히, 이온교환수지에서 용출된 각 분획물질은 NaCl을 제거시키기 위해 투석을 행한 후 동결 건조시키고, 당 함량과 AYS의 활성을 측정하였다. 이때 chromatography와 관련된 모든 조작은 4°C에서 행하였다.

결과 및 고찰

Isopropanol 침전분획에 따른 AYS의 활성

전보[16]에서 기술한 AYS(항효모성 물질)는 여러 가지 당의 polymer로 구성되어 있으며, 또한 *R. aqualis*속의 균주들은 균체 외로 고분자 당을 분비한다는 보고[14, 17, 19]가 있어, AY2000균주가 생산하는 고분자당이 AYS와 관련이 있을 것이라고 생각하고, AY2000균주의 배양액에 수용성 용매를 첨가하여 고분자 당을 침전시키고 형성된 침전물의 효모에 대한 활성을 조사하였다. 먼저 AY2000균주의 배양액에 isopropanol을 가하여 분획시킨 침전물에 대한 AYS의 활성을 조사한 결과 AY2000균주의 배양액에 2배량의 isopropanol을 첨가하여 형성된 침전물은 AYS의 활성 소실 없이 그대로 유지하고 있었다(MIC; 7.8-15.6 µg/mL) (Table 1). 또한 이 방법으로 회수된 AYS는 전보[16]에서 기술한 AY2000균주의 배양액을 40°C에서 농축시킨 후 methanol 2배량을 가하여 조제한 AYS 보다 활성이 더 잘 유지되었다(MeOH 침전물의 MIC; 15.6-31.2 µg/mL, Isopropanol 침전물의 MIC; 7.8-15.6 µg/mL). 한편 AY2000균주의 배양액에 2배량의 acetone의 첨가는 AYS의 활성을 오히려 감소시켰으나, 2배량의 ethanol 첨가는 isopropanol 첨가와 거의 동일한 활성을 나타내었다(Acetone 침전물의 MIC; 62.5-125 µg/mL, Ethanol 침전물의 MIC; 7.8-15.6 µg/mL). 따라서 전보[16]에서 기술한 유기용매 MeOH에 의한 침전이 AYS의 활성에 저하를 가져오는 한 원인이었다고 생각되며, 이후 실

험은 별도의 언급이 없는 한 배양액에 2배량의 isopropanol을 가하여 조제한 동결건조 분말을 본 실험의 AYS로 사용하였다. 이 isopropanol에 의해 조제된 AYS의 당과 단백질의 함량 비는 2:1-3:1이었으며, UV spectrum을 조사해 본 결과는 230 nm과 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다 (data 미제시).

AYS의 열 안정성

온도에 따른 AYS의 활성을 조사하기 위해 먼저 AYS를 멸균수에 녹인 후 1시간에서 5시간까지 시간별로 50°C에서 열처리를 행하고, 열처리된 AYS의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 열처리된 AYS의 활성은 시간에 따라 점차 감소하였으며, 특히 50°C에서 5시간 이상의 열처리는 AYS의 활성을 거의 소실시켰다. 따라서 AYS는 50°C에서 1시간 만 열처리하여도 AYS 활성이 감소되는 것으로 보아 AYS는 열에 불안정한 물질이며, 전보[16]에서 기술한 40°C에서 장시간(2-3일) 동안 AYS를 감압농축

Table 1. Anti-yeast activity on fractions precipitated with isopropanol at cultured broth of the strain AY2000.

Fraction precipitated with Isopropanol	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Cultured broth only	7.8-15.6
Cultured broth-Isopropanol (1 : 2)	7.8-15.6
Cultured broth-Isopropanol (1 : 3)	> 500
Cultured broth-Isopropanol (1 : 4)	> 500

The strain AY2000 was cultured in MYCS broth at 25°C for 24 hr, and supernatant from the cultured broth was collected after centrifugation (12,000 rpm, 10 min, 4°C). The precipitation was made in the supernatant with addition of 2-fold, 3-fold, and 4-fold isopropanol, successively. Each precipitation was dissolved in distilled water and the solution was dialyzed in membrane (SPECTRA/POR; MW cutoff 6,000-8,000) at 4°C to discard isopropanol. The remaining substance in the dialysis membrane was collected and lyophilized with a freezing dryer. MIC was expressed as range of average values calculated from duplicate experiments twice.

Table 2. Heat stability of AYS.

Treatment	Heat treatment					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	7.8-15.6	15.6-31.2	31.3-62.5	62.5-125	62.5-125	125-250

AYS (10 mg/mL) solution was incubated at 50°C, and the remaining activity of the AYS against *S. cerevisiae* was determined. MIC was expressed as range of average values calculated from duplicate experiments twice.

Table 3. pH stability of AYS.

Treatment	pH treatment					
	None	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5	pH 8.5
MIC (mg/mL)	7.8-7.8	15.6-15.6	15.6-15.6	15.6-31.3	15.6-31.3	15.6-31.3

The buffers used in this study were 10 mM acetate buffer (pH 4.5-5.5), 10 mM phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$; pH 6.5), and 10 mM Tris-HCl (pH 7.5-8.5). AYS (10 mg/mL) was dissolved in each buffer, and incubated at 50°C for 2hr. MIC was expressed as range of average values calculated from duplicate experiments twice.

과정이 활성의 감소를 일으키는 주요한 원인이라고 생각된다. 따라서 본 실험에서 AYS의 취급은 가능한 한 4°C를 유지하였다.

AYS의 pH 안정성

AYS가 열에 불안정함으로 pH에 의해서도 활성이 감소되는지를 조사하고자 AYS 일정량을 각 완충액에 용해하고, 50°C에서 2시간 동안 방치한 후 즉시 4°C로 냉각시켜서, 각 완충액 내에서 열처리된 AYS의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 table 3에서 보는 바와 열핏 보아서는 pH처리를 행하지 않은 대조구에 비해서 pH처리가 AYS활성에 저하를 나타낸 것 같았으나, 이는 Table 2의 결과로 미루어 보아 열처리(50°C)에 의한 활성 저하라고 생각되며, 최소한 pH 4.5에서 pH 8.5 범위에서 pH처리는 AYS 활성에 영향을 미치지 못하였다.

화학물질 처리에 의한 AYS의 안정성

AYS가 화학물질들에 노출되면 활성에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 먼저 AYS를 멸균수에 용해시키고, 각 화학물질과 혼합하여 28°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 잔존하는 AYS의 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 β -mercaptoethanol이나 dithioerythritol처리는 AYS의 활성을 급격히 약화시켰으나, EDTA나 NaCl처리는 AYS의 활성에 전혀 영향을 미치지 않았다. 이는 β -mercaptoethanol이나 dithioerythritol은 일종의 thiol 화합물로 AYS를 강하게 환원시켜서 AYS의 활성저하를 초래하였다고 생각된다. 이때, EDTA는 AY2000균주의 배지에 10 mM FeCl_3 의 첨가가 AYS의 생성에 중요한 인자로 작용함 [10]으로 철 이온과 AYS 활성과의 관련성을 조사하기 위함이다. NaCl은 이온교환수지를 사용하여 AYS를 정제할 경우 AYS 성분의 일부가 이온교환수지에 흡착되고 흡착된 부분을 충분히 용출하기 위해 사용됨으로 NaCl이 AYS의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 따라서 사용된 화학물질들 중

Table 4. AYS stability by chemical reagents.

Treatment	Chemical reagent				
	None	β -mercaptoethanol	Dithioerythritol	EDTA	NaCl
MIC (mg/mL)	7.8-7.8	62.5-125	31.2-62.5	7.8-7.8	7.8-7.8

The chemical reagent treated was 0.8 M NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM dithioerythritol, and 10 mM Na₂-EDTA, respectively. AYS was treated with each chemical reagent at 28°C for 1 hr. MIC was expressed as range of average values calculated from duplicate experiments twice.

에서 thiol화합물만이 본 AYS에 활성저해를 일으키는 한 요인이 되었다.

Chromatography에 의한 분획과 항효모 활성

AYS를 Sephacryl S-400 gel로 분자여과를 행하고 분획물에 대해 항효모 활성을 측정하였다. 이때 각 분획물에 함유된 고분자당과 미지의 물질(230 nm)의 함량을 상기에 기술한 방법에 따라 모두 측정하였다. 따라서 분자여과에서는 하나의 peak가 형성(Fraction no.15-33) 되었으며, 이 peak를 형성하는 분획들을 모두 모아서 동결 건조시킨 후 AYS의 활성을 측정한 결과 효모에 대한 MIC가 7.8-15.6 μ g/ml이었다(Fig. 1A). 한편, DEAE-cellulose 이온교환수지로 AYS를 분획한 결과(Fig. 1B)에서 다양한 peak가 분획되었으며, 우선 이온교환수지에 비흡착된 물질(Fraction no.1-9)과 흡착

된 물질로 나누고, 흡착물질들은 NaCl의 농도를 증가시키면서 이온교환수지로부터 용출시켰다. 이들 중에 0.1 M NaCl로 용출된 분획(Fraction no.21-27)에서는 주로 당 함량이 많았으며, 0.4 M NaCl로 용출된 분획(Fraction no.81-92)에서는 당 보다 미지 물질이 많이 포함되어 있었다. 따라서 이들 분획은 모두 NaCl을 제거하기 위해 증류수로 4°C에서 투석한 후에 동결 건조시키고, 평량하여 분획된 AYS의 농도가 10 mg/mL가 되도록 멸균수에 다시 용해시켜서 AYS의 활성을 측정한 결과 흥미롭게도 모든 분획에서 AYS의 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이때 이온교환수지에 주입된 AYS의량은 50 mg이었으며, 분리된 각 분획을 모두 합쳐서 활성을 측정하였지만 효모에 대한 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이 결과는 AYS는 고분자 당과 미지의 물질이 결합된 상태로 존재하는 gel여과(Fig. 1A)에서는 효모에 대한 활성이 그대

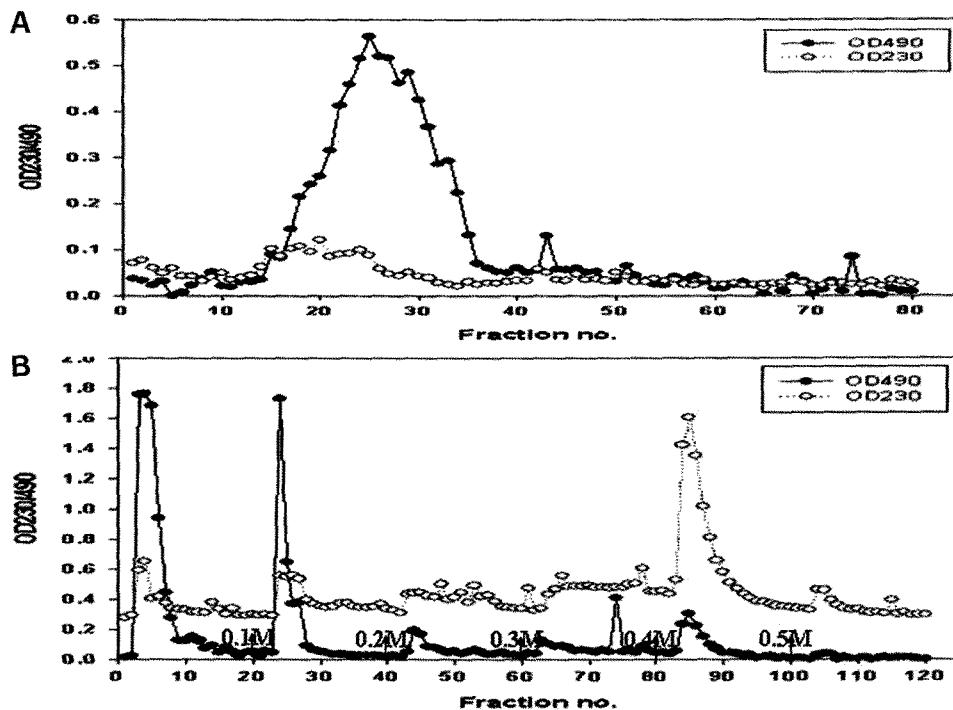


Fig. 1. Fractionation of the AYS on Chromatography. Sepharose S-400 gel filtration (A) and DEAE-cellulose ion exchange column chromatography (B) was performed, respectively. The AYS (10 mg) was applied on Sephacryl S-400 gel filtration (FFF1.3×87 cm) and eluted with distilled water at flow rate (7.6 mL/hr). The AYS (50 mg) was applied on DEAE-cellulose column chromatography (FFF1.3×5 cm), and eluted stepwisely with 20 mM acetate buffer (pH 5.0) containing NaCl (0.1 M-1.0 M) at flow rate (40 mL/hr) at 4°C. The each collected fraction (5 ml/tube) was determined by Method of phenol-sulfuric acid and OD at 230 nm.

로 유지되지만, 이온교환수지를 통한 이들의 분리 (Fig. 1B)는 활성소실을 초래하였다고 생각된다. 비록 본 연구를 통해 AYS의 활성에 영향을 주는 몇 가지 인자들은 밝혀졌지만, 이들 외에도 AYS의 활성소실과 관련된 인자들이 더 있을 것이라고 생각되며 아울러 정제된 AYS의 작용 메커니즘에 대한 연구도 더 이루어져야 될 과제이다. 따라서 전보[16]에서 기술한 저장 중에 AYS의 활성소실의 원인은 열에 불안정한 AYS를 40°C에서 장시간(2-3일) 동안 감압농축과정을 반복함으로써 그 활성이 점차 감소되었다고 생각되며, methanol처리에 의한 AYS의 침전과정 또한 약하지만 AYS의 활성을 저하시킨 원인으로 작용하였다고 생각된다. 따라서 앞으로 새로운 방법으로 AYS를 정제하는 경우는 반드시 저온에서 AYS를 취급하여야 하고, 또한 β -mercaptoethanol 등 환원성 물질의 첨가나 이온교환수지에 의한 고분자당과 미지의 물질이 분리되지 않는 조건을 고려해야 한다는 결론을 얻었다.

요 약

Rahnella aquatilis AY2000 균주는 항효모성 물질(AYS)을 생산하지만, AYS가 저장 중에 활성이 감소되는 경향이 있었다. 따라서 본 연구에서는 AYS활성이 저하되는 원인을 알아보기 위하여 AYS에 다양한 이화학적인 처리를 행하였다. 그 결과 열처리가 AYS의 활성을 감소시키는 하나의 인자이며, AYS를 침전시키는 유기용매인 methanol의 사용 또한 AYS의 활성을 감소시키는 원인이었다. 또한 β -mercaptoethanol 과 dithiothreitol 등 thiol화합물 역시 AYS의 활성을 감소시키는 인자로 작용하였으나, pH, EDTA나 NaCl은 AYS의 활성저하를 가져오지 않았다. 한편, 정제과정에서 AYS의 조성분 중 다당류와 미지의 물질(230 nm)을 DEAE-cellulose 이온교환수지로 분리시키면 AYS의 활성이 완전히 소실되지만, AYS를 Sephacryl S-400 gel 여과를 행하여 이들 성분이 분리되지 않은 상태에서는 그 활성이 잘 유지되었다. 본 실험에 사용된 AYS의 MIC는 *S. cerevisiae* 대해 7.8-15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위로 측정된다.

감사의 말

본 연구는 2008년도 동의대학교 학술연구비 지원에 의한 논문임.

REFERENCES

- Bauman, P., D. J. Brenner, J. J. Farmer, W. Frederiksen, and J. M. Shewan. 1984. Facultatively anaerobic Gram-negative Rods, pp. 506-513. In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- Berge, O., T. Heulin, W. Achouak, C. Richard, R. Bally, and J. Balandreau. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can. J. Microbiol.* **37**: 195-203.
- Calvo, J., V. Calente, M. E. de Orellano, D. Benuzzi, and M. I. S. de Tosetti. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 251-257.
- Cankar, K., H. Kraigher, M. Ravnkar, and M. Rupnik. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 341-345.
- Carinder, J. E., J. D. Chua, R. B. Corales, A. J. Taege, and G. W. Procop. 2001. *Rahnella aquatilis* bacteremia in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**: 471-473.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1951. A colorimetric method for determination of sugars. *Nature.* **168**: 167-167.
- El-Hendawy, H. H., M. E. Osman, and N. M. Sorour. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas compestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* **160**: 343-352.
- Hashidoko, Y., E. Itoh, K. Yokota, T. Yoshida, and S. Tahara. 2002. Characterization of five phyllosphere bacteria isolated from *Rosa rugosa* leaves, and their phenotypic and metabolic properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2474-2478.
- Jensen, N., P. Varelis, and F. B. Whitfield. 2001. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 339-343.
- Kang, M. J., B. K. Lee, and K. H. Kim. 2008. Characteristics of *Rahnella aquatilis* strain AY2000 for an anti-yeast substance production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 215-220.
- Kim, K. Y., D. Jordan, and H. B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 895-898.
- Laux, P., Ö. Baysal, and W. Zeller. 2002. Biological control of fire blight by using *Rahnella aquatilis* Ra39 and *Pseudomonas* sp. R1. *Acta Hort.* **590**: 225-229.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Matsuyama, H., R. Sasaki, K. Kawasaki, and I. Yumoto. 1999. Production of a novel exo-polysaccharide by *Rahnella aquatilis*. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 180-183.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Tentative Standard M27-T*. NCCLS, Vilanova, PA.
- Ryu, E. -J., H. -W. Kim, B.-W. KIM, H. -J. Kwon, and K.-H. Kim. 2006. *Rahnella aquatilis* strain AY2000 produces an anti-yeast substance. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 1597-

- 1604.
17. Tallgren, A. H., U. Airaksinen, R. Weissenberg, H. Ojamo, J. Kuusisto, and M. Leisola. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 862-864.
18. Vasanthakumar, A., and P. S. McManus. 2004. Indole-3-acetic acid-producing bacteria are associated with cranberry stem gall. *Phytopathol.* **94**: 1164-1171.
19. Yoo, S. H., E. J. Yoon, J. Cha, and H. G. Lee. 2004. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* **34**: 37-41.

(Received Sep. 19, 2008/Accepted Oct. 16, 2008)